

Isoenzymnachweis auf Celluloseacetatfolien

**Analysen der Isoenzymmuster der Pseudo-
cholinesterase und der Lactatdehydrogenase**

von

Margarethe Aplas, geb. Schultz

aus

Charkow

1968

1971 # 65

Aus der Abteilung für klinische Immunologie
des Universitätskrankenhauses Erlangen-Nürnberg
Vorstand: Professor Dr. med. F. Scheiffarth

Isoenzymnachweis auf Celluloseacetatfolien

Analysen der Isoenzymmuster der Pseudo-
cholinesterase und der Lactatdehydrogenase

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt

von

Margarethe Aplas, geb. Schultz

aus

Charkow

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät der
Universität Erlangen-Nürnberg

Dekan: Prof. Dr. med. dent. A. Kröncke
Referent: Prof. Dr. med. F. Scheiffarth
Tag der mündlichen Prüfung: 17. 12. 1968

Meinen lieben Eltern

in Dankbarkeit gewidmet

I n h a l t s v e r z e i c h n i s

Seite

Einleitung	1
Versuchsordnung und Methodik	2 - 8
Ergebnisse	8 - 11
Diskussion	11 - 13
Zusammenfassung	13 - 14
Literaturverzeichnis	15 - 17

E i n l e i t u n g :

Im Rahmen klinischer Routineuntersuchung ist die Auswertung von Isoenzymkonstellationen unentbehrlich geworden. Sie gestattet bekanntlich in einer Reihe von Fällen sichere Rückschlüsse auf die Organmanifestation bzw. -lokalisation bestimmter Krankheitsprozesse. Eine wichtige Voraussetzung für eine derartige klinische Enzymdiagnostik ist jedoch die jeweils geeignete Schnellmethode zur Entwicklung solcher Enzymmuster.

Die Kombination von Elektrophorese und biochemischem Enzymnachweis, hier vor allem unter Ausnutzung von Farbreaktionen mit der Möglichkeit einer Bestimmung der Isoenzymrelationen durch Extinktion der Farbtintensitäten, stellt eine der elegantesten Methoden auf diesem Sektor dar.

Die in den letzten Jahren in zunehmendem Maße verbreitete Elektrophorese auf Celluloseacetatfolien erlaubt eine derartige Kombination grundsätzlich in gleicher Weise wie die Elektrophorese in anderen Trennmedien, etwa Agargel oder Stärkegel. Es bedarf aber nunmehr der Übertragung dieser kombinierten biochemischen Verfahren auf die Acetatfolie, wobei die qualitativen Unterschiede der verschiedenen Trennmedien und die damit verbundenen unterschiedlichen Elektrophorese- und Diffusionseigenschaften der zu analysierenden biologischen Flüssigkeiten wie auch der Inkubations- bzw. Färbelösungen einige Abänderungen in den herkömmlichen Enzymnachweisverfahren erforderlich machen.

Die einschlägige Literatur weist bereits eine Reihe von Arbeiten auf, die diesen Forderungen weitgehend nachkommen (1a-c, 2, 3, 7, 8a-f, 9). In vorliegender Untersuchungsserie sollten als weitere Bereicherung die Enzymnachweisverfahren für Pseudocholinesterasen (PSE) auf Acetatfolien ausgearbeitet und die Methoden zur Darstellung der Lactatdehydrogenase (LDH)-Isoenzymmuster mit der besonderen Fragestellung nach einer klinisch verwertbaren Schnellmethode, ebenfalls auf Acetatfolien, überprüft werden.

Zur exakten Zuordnung der verschiedenen Isoenzyme zu dem System der bekannten Serumproteine wurde mit jedem Analysensatz ein gleichartiges Serum mit Proteinfärbung ausgewertet.

I) Versuchsanordnung und Methodik

1) Versuchsanordnung

Es wurden insgesamt 25 Humanseren, davon 10 Seren von Gesunden, die übrigen 15 von Patienten mit verschiedenen Krankheitsprozessen, sowie 10 Seren von unbehandelten Albinoratten und 15 Seren von tumortragenden Ratten auf folgende Weise analysiert:

1. Elektrophoretische Trennung auf Celluloseacetatfolien
2. Nachweis der Cholinesterase (CHE) (CAF)
3. Nachweis der Pseudocholinesterase (PSE)
4. Nachweis der Lactatdehydrogenase (LDH)
5. Proteinfärbung jeweils eines Vergleichstreifens

	Humanseren		Rattenseren	
	Seren von Gesunden	Path.Seren	Unbehandelte Ratten	Tumortragende Ratten
Anzahl d.Seren	10	15	10	15
	Einzelanalysen je Serum			
	CAF-Elphor + Nachweis d.Cholinesterase			
	CAF-Elphor + Nachweis d.Pseudocholinesterasen			
	CAF-Elphor + Nachweis d.Lactatdehydrogenase			
	CAF-Elphor + Darstellung der Serum- und Plasma- proteine			

Die insgesamt 50 Plasmen von Mensch und Ratte wurden nur mit CAF-Elektrophorese und nachfolgender Proteinfärbung untersucht.

2) Methodik

a) Gewinnung und Aufbereitung der Seren und Plasmen

Die menschlichen Seren wurden in üblicher Weise von Nüchternen durch Venenpunktion gewonnen, die Seren der Ratten durch Kappung des Schwanzendes. Plasmen wurden jeweils durch Zusatz von Natrium citricum zum Venenblut im Verhältnis 1:10 gewonnen. Es wurden für die vorliegenden Analysen prinzipiell nur lipämie- und hämolysefreie Seren und Plasmen verwendet.

b) Elektrophorese auf Celluloseacetatfolien

Das Prinzip der Elektrophorese ist hinlänglich bekannt, so daß im Rahmen dieser Ausführungen hierauf nicht näher eingegangen zu werden braucht.

Methodisch wurde nach Angaben von KOHN (8a,b,e), hier unter Verwendung der Elektrophoresekammer der Fa.

BENDER und HOBEIN +) sowie der von der gleichen Firma gelieferten Celluloseacetatfolien ++) vorgegangen.

Für die Enzymnachweise wurden pro Analyse eine Serummenge von 15-20 µl aufgetragen, für die Proteindarstellung eine Menge von 8 µl.

c) Nachweis der Cholinesterase

Hierzu wurde die Methode unter Verwendung von Indoxylacetat nach den Angaben von URIEL (13a,b) gewählt.

Prinzip der Methode:

Indoxylacetat wird unter dem Einfluß spezifischer Cholinesterase abgebaut, wobei Indoxyl freigesetzt und durch den atmosphärischen Sauerstoff zu Indigo (Blaufärbung) oxydiert wird. Die Farbe ist licht- und temperaturbeständig. Die Intensität der Farbreaktion ist direkt proportional zur Fermentaktivität.

Reagenzien:

Indoxylacetat

Aceton

Na-Veronal-Puffer mit einem pH = 8,2 - 8,6 und einer Ionenstärke von $\mu = 0,05$

Kupferazetat 10^{-3} molar

Aufbereitung der Pufferlösung:

9,78 g Veronal-Natrium

6,47 g Natriumacetat

60 ml n/10 HCl

werden mit destilliertem Wasser auf 1 l aufgefüllt.

Der Puffer kann in der Flasche einige Wochen lang aufbewahrt werden. Durch Zusatz von 1 ml 5% iger Thymol-lösung in Isopropanol pro Liter Puffer wird die Haltbarkeit der Puffers wesentlich verbessert.

+) Multelphorkammer der Fa. Dr. BENDER und Dr. HOBEIN, München
++) Selecta-Elektrophoresefolien 18 x 160 mm zur Elphor-Kurzzeit-Elektrophorese; hergestellt bei SCHLEICHER & SCHÜLL/
Dassel

Aufbereitung der Inkubationslösung:

5 mg Indoxylacetat werden in 0.5 ml Aceton gelöst und unmittelbar danach mit 22 ml Na-Veronal-Puffer und 2.5 ml der 10^{-3} molaren Kupferazetatlösung versetzt. Die Lösung muß innerhalb von 8 Stunden verwendet werden.

Arbeitsgang:

Unmittelbar nach abgeschlossener Elektrophorese werden die CA-Folien in die bereitete Inkubationslösung gelegt und bei 37° im Wärmeschrank inkubiert. Dabei wurden verschiedene Inkubationszeiten gewählt, und zwar zwischen 20 min und 6 Stunden.

d) Nachweis der Pseudocholinesterasen

Der Nachweis der Pseudocholinesterasen erfolgte unter Anwendung der Azokuppelungsmethode mit β -Naphthylacetat nach URIEL (13a, b).

Prinzip der Methode:

β -Naphthylacetat wird durch verschiedene Esterasen (Ali-Esterasen bzw. Pseudocholinesterasen) gespalten unter Freisetzung von β -Naphthol, das mit einem Diazoniumsalz eine rotviolette Färbung ergibt.

Reagenzien:

β -Naphthylacetat

Aceton

Phosphatpuffer nach SÖRENSEN mit einem pH von 7,4 und einer Ionenstärke von $\mu = 0,15$

Diazo-Blau B

Aufbereitung der Pufferlösung:

Pufferzusammensetzung:

Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) (für A-Lösung)

di-Natriumhydrogenphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) nach SÖRENSEN (für B-Lösung).

Zuerst werden 2 $1/15$ molare Lösungen von den oben angeführten Substanzen hergestellt. ($1/15$ mol. Lösung A und $1/15$ mol. Lösung B). Der Puffer wird nach der Formel zusammengestellt: X ml A-Lösung + (100 - X) ml B-Lösung. Für die Herstellung von 1 l Phosphatpuffer wurden 804 ml Lösung B mit 196 ml Lösung A aufgefüllt. Die Kontrolle

mit der Glaselektrode ergab für den Puffer einen pH-Wert von 7.35.

Aufbereitung der Inkubationslösung:

5 mg β -Naphthylacetat werden in 0.25 ml Aceton gelöst. Dazu werden 25 ml Phosphatpuffer hinzugegeben. Es bildet sich eine opaleszente Lösung, in der man direkt 10 mg Diazo-Blau B auflöst. Die Lösung wird filtriert und sofort verwendet.

Arbeitsgang und Auswertung:

Sofort nach Abschluß der Elektrophorese kommen die CA-Folien bei 37°C 1 Stunde lang in die vorbereitete Inkubationslösung. Anschließend werden sie kurz in 2% iger Essigsäure gewaschen, was wegen stärkerer Entfärbung der Fraktionen auch unterlassen werden kann. Es genügt ein leichtes Abstreifen der überschüssigen Farblösung von der Folie mit einer Rolle oder der Fingerkuppe. Zur Transparenz der Folie wird der Streifen blasenfrei auf eine Glasplatte aufgezogen und für 2-5 min in ein Transparenzbad +) eingelegt. Danach wird der Streifen 5-10 min im Trockenschrank bei 105° getrocknet. Dieser Vorgang erfordert besondere Sorgfalt und muß im Hinblick auf die starke Entfärbung der gefärbten Enzymfraktionen sehr zügig vonstatten gehen.

Die Auswertung des Isoenzymmusters erfolgt durch Betrachtung bzw. Photographie sowie durch photometrische Auswertung mit dem Zeiss-Extinktionsschreiber ++). Diese Auswertung kann sowohl am transparent gemachten CA-Streifen als auch am feuchten, nur gefärbten Streifen vorgenommen werden.

e) Nachweis der Lactatdehydrogenase

Es wurde die für die Elektrophorese im Agargel ausgearbeitete Methode nach VAN DER HELM (12,14) in der Modifikation für CA-Folien nach BARNETT (1c) gewählt.

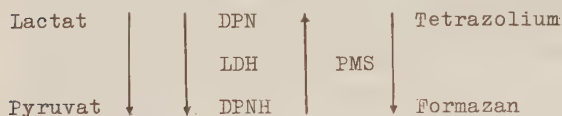
Prinzip der Methode:

Für die von VAN DER HELM auf die Agarelektrophorese angewandte Tetrazoliummethode zum Nachweis LDH-aktiver Fraktionen gilt nach DEWEY und CONKLIN (4) folgender

+) Elphor-Transparenzbad Dr. BENDER und Dr. HOBEIN, München

++) Extinktionsschreiber der Fa. ZEISS, Oberkochen

Reaktionsmechanismus (s.a.Schema): die DPN-abhängige Lactatdehydrogenase oxydiert das Lactat zu Pyruvat, das durch Cyanid als Oxynitril gebunden und aus dem Reaktionsgleichgewicht entfernt wird. Das reduzierte Coferment wird wahrscheinlich durch Elektronenabgabe an das Phenazinmethosulfat reoxydiert, während das Nitroblautetrazolium durch Elektronenaufnahme vom Phenazinmethosulfat in unlösliches Formazan überführt wird. Dieses imponiert als



Reaktionsablauf der LDH-Färbung

violette Färbung, die im Falle des Enzymnachweises in einem elektrophoretisch getrennten Proteingemisch in mehrere Banden aufgeteilt ist. Es besteht eine lineare Beziehung zwischen der Farbkonzentration aller Banden und verschiedenen Mengen desselben Serums im Bereich von 2-10 µl.

Für die nachfolgenden Analysen wurde anstelle des DPN (= Diphosphopyridinnucleotid) NAD (=Nicotinamidadenindinucleotid) gewählt. Auf den Zusatz von Cyanid wurde verzichtet.

Reagenzien:

Natriumlactat (M)

NAD 10 mg/ml

Nitroblautetrazolium (Nitro-BT) 1 mg/ml

Phenazinmethosulfat (PMS) 1 mg/ml

Aufbereitung der Inkubationslösung:

Zuerst wird eine molare Lösung von Na-Lactat hergestellt; dafür werden 2 ml einer von der Firma fertig gelieferten 50%igen Na-Lactat-Lösung mit Aqua dest. auf 9 ml aufgefüllt. 1 Vol. Natriumlactat (M) wird mit 1 Vol. einer 1%igen Lösung von NAD in Aqua dest. versetzt. Dazu werden 3 Vol. einer 0,1%igen wässrigen Lösung von Nitro-BT sowie 0,3 Vol. einer 0,1%igen Lösung von Phenazinmethosulfat in

Aqua dest.hinzugefügt.Diese Lösung wird jeweils frisch aufbereitet.

Arbeitsgang:

Es wird eine feuchte Kammer vorbereitet und auf deren Boden eine gereinigte Glasplatte aufgelegt.Die frisch bereitete Inkubationslösung wird auf die Glasplatte mit Pipette aufgetragen und ein blanker CA-Streifen ("Reagenzstreifen") flach darauf gelegt,so daß er die Lösung gleichmäßig aufsaugt.Der Streifen von 18x160mm Ausmaß bedarf etwa 0,3 ml Lösung.Die CA-Folie mit aufgetrennten Banden ("Analysenstreifen") wird aus der Elektrophoresekammer herausgenommen und sofort auf den Reagenzstreifen gelegt.Um Blasen auszustreichen,fährt man mit der Walze darüber.Dieser Vorgang geht schnell vor sich,um jegliches Austrocknen der Folien zu umgehen. Die Färbeschale wird unverzüglich verschlossen und in den Inkubator bei 37°C für 30-45 min gestellt.Danach werden die Streifen voneinander gelöst und der Analysenstreifen ebenso wie der nunmehr - durch Abklatsch - mitgefärbte Reagenzstreifen in 5% iger Formalinlösung fixiert (Zeit unbegrenzt).

Dokumentation:

Die gewonnenen Farbreaktionen werden photographisch sowie photometrisch festgehalten.Zu diesem Zweck wurden die noch feuchten Streifen aus der Formalinlösung auf eine Glasplatte blasenfrei aufgelegt und im Auflichtverfahren photographiert bzw.über eine Lichtquelle mit einem Integralschreiber +) extinktiometrisch ausgewertet. Transparenz der Streifen ist nicht erforderlich,aber prinzipiell möglich.

f) Proteinfärbung

Für die Proteinfärbung wurde Amidoschwarz 10 B verwendet.

Reagenzien:

Amidoschwarz 10 B

Methanol

Sisessig

+) Extinktionsschreiber der Fa. ZEISS, Oberkochen

Aufbereitung der Farblösung:

1,0 g Amidoschwarz 10 B wird mit einer Methanol-Eisessig-Lösung (9: 1) auf 200,0 ml aufgefüllt.

Arbeitsgang und Auswertung:

Nach Abschluß der elektrophoretischen Trennung werden die pufferfeuchten CA-Streifen für ca 5 min in die bereitete Farblösung gelegt. Der überschüssige Farbstoff wird anschließend im Entfärbebad (Mathanol/Eisessig 9:1), das 2-3 mal gewechselt werden soll, vollständig ausgewaschen. Entfärbezeit dauert jeweils 5 min. Danach werden die Streifen auf eine Glasplatte blasenfrei aufgelegt, 3 bis 5 min in ein Transparenzbad +) gegeben und anschließend 5-10 min bei 105°C getrocknet. Der Streifen wird nunmehr photo-metrisch mit dem ZEISS-Extinktionsschreiber ausgewertet.

II) Ergebnisse

1) Darstellung esteraseaktiver Fraktionen

a) Im menschlichen Serum

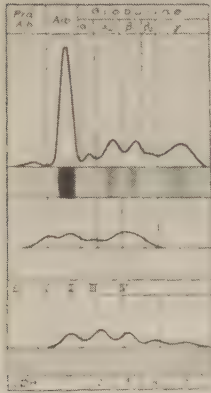
Es muß zunächst festgestellt werden, daß der Nachweis der Cholinesterase mit der hier angewandten Methode unter Verwendung von Indoxylacetat nicht gelang.

Dagegen konnten mit der Azokuppelungsmethode unter Verwendung von β -Naphthylacetat in allen hier untersuchten Seren-normalen wie pathologischen-im Bereich zwischen Prä-Albumin und β_1 -Globulin-Fraktion mit Regelmäßigkeit zwei Enzymkomplexe nachgewiesen werden, von welchen wenigstens die weit anodisch gewanderte Farbzone zwei Subfraktionen erkennen ließ. Zwischen Komplex 1 und Komplex 2 war darüber hinaus in 22 von den 25 untersuchten Seren eine weitere Farbreaktion zu erkennen, so daß insgesamt 4 Isoenzyme der Pseudocholinesterasen resultierten, die mit E_I, E_{II}, E_{III} und E_{IV} bezeichnet wurden.

Bei Vergleich der hier dargestellten esteraseaktiven Fraktionen mit den jeweils entsprechenden Proteinfraktionen konnte eine exakte Zuordnung der fermentaktiven Komponenten (Isoenzyme) zu einem bestimmten Protein nicht immer erfolgen. E_I und E_{II} waren in einem Wanderungsbezirk von

+) Elphor-Transparenzbad der Fa. Dr. BENDER u. Dr. HOBEIN, München

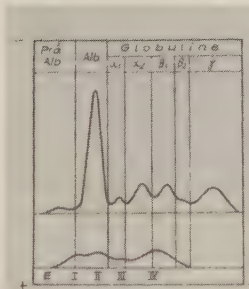
Abb.1a:

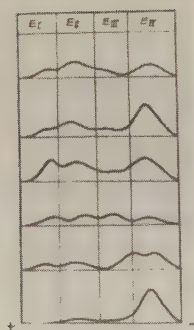


Elektrophorese auf Celluloseacetatfolien. Gegenüberstellung der Befunde je einer Serumanalyse oben mit Darstellung der einzelnen Proteinkomponenten unter Verwendung von Amidoschwarz 10 B, Mitte mit Darstellung der Pseudocholinesterasen unter Verwendung von β -Naphthylacetat, unten mit Darstellung der Isoenzyme der Lactatdehydrogenase unter Verwendung von Tetrazolimblau.

Abb.1b:

Isolierte Darstellung der Diagramme eines Proteinmusters(oben) und der Isoenzyme der Pseudocholinesterase.





Normalverteilung

Leberparenchymschaden

Arthritis urica

chronische rezidivierende Infekte
(insgesamt ungeklärtes Krankheitsbild)
chronische Bronchitis

Myelom

Abb. 2:

Gradientenkurven verschiedener Isoenzympmuster der Pseudocholesterase.

Man beachte die Relationsverschiebungen innerhalb der esteraseaktiven Komponenten: Oben Normalverteilung; b) stärkeres Hervortreten der E_{IV} -Fraktion bei relativer Verminderung der übrigen Komponenten; c) deutlich verstärkte E_I -Fraktion; d) Hervortreten der sonst nur schwach gefärbten E_{III} -Fraktion; e) Doppelung der E_{IV} -Fraktion bei Fehlen der E_{III} -Komponente; f) isolierte Anreicherung der E_{IV} -Fraktion bei Schwund der übrigen esteraseaktiven Komponenten.

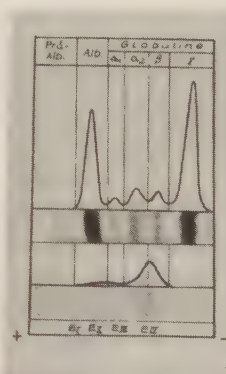


Abb. 3: Beispiel für Myelom

Präalbuminen bzw. Postalbuminfraktionen (oder schnell wandernder α_1 -Globuline) nachzuweisen, E_{III} zwischen α_1 - und α_2 -Globulinen, E_{IV} konnte ziemlich eindeutig der Gruppe der α_2 -Globuline zugeordnet werden (Abb. 1a,b).

Unter pathologischen Seren konnte eine große Variationsbreite der Isoenzymmuster wahrgenommen werden, wobei es sich in den meisten Fällen um Relationsverschiebungen der beschriebenen Pseudocholinesterase-Komponenten handelte, nur in wenigen Fällen traten auch Unterschiede in der Komposition der Esterasemuster auf (Abb. 2.u.3). In keinem der hier untersuchten Seren waren allerdings Fraktionen im elektrophoretischen Wanderungsbereich der β - oder γ -Globuline nachzuweisen.

b) In Rattenserem

Esteraseaktive Fraktionen konnten auch in Rattenserem nur mit der Azokuppelungsmethode unter Verwendung von β -Naphthylacetat dargestellt werden; es ließen sich mit anderen Worten auch hier nur Pseudocholinesterasen nachweisen. Dabei war auffällig, daß in den Seren der unbehandelten Tiere, ähnlich wie beim Menschen, ausschließlich im Bereich zwischen Albuminen und α_2 -Globulinen insgesamt vier Farbzonen in Erscheinung traten.

Die hier untersuchten pathologischen Rattenserem zeigten im wesentlichen Relationsänderungen dieser fermentaktiven Fraktionen, nicht jedoch qualitative Besonderheiten.

2) Darstellung lactatdehydrogenaseaktiver Fraktionen

a) Im menschlichen Serum

Mit der vorerwähnten Methode konnten im menschlichen Serum des Gesunden mit Regelmäßigkeit 5 (6) Farbzonen nachgewiesen werden, die mit der üblichen Bezeichnung LDH₁₋₅ belegt wurden, wobei 1 nach 5 die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit von Albumin nach γ -Globulin berücksichtigt. Die relative Verteilung dieser Isoenzyme beim Gesunden besteht darin, daß LDH 1, 2 und 3 am stärksten vertreten sind, während LDH 4 und 5 nur schwach zur Darstellung gelangen (Abb. 4).

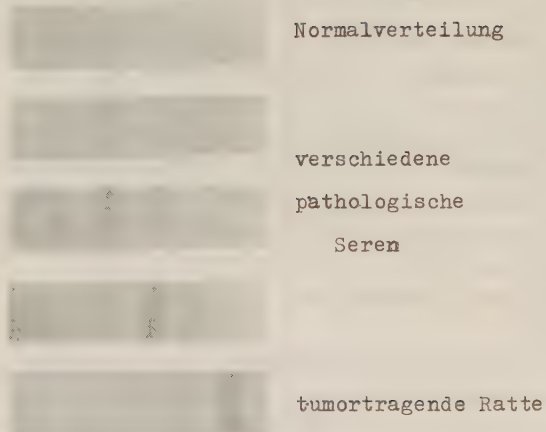


Abb. 4: Elektrophorese auf Celluloseacetatfolien mit nachfolgender Darstellung der Isoenzyme der Lactatdehydrogenase. Wiedergabe der Streifen mit verschiedenen Verteilungsmustern. Man beachte die unterschiedlichen Farbtintensitäten mit relativer "Links-" oder "Rechtsverschiebung". Unten das Serum einer tumortragenden Ratte, bei welchem die Reduzierung des Isoenzymmusters bis auf eine einzige Komponente, LDH_5 , auffällt; zu bemerken ist hier, daß im Serum der gesunden Ratte die Isoenzymkomponente LDH_5 so gering konzentriert vorkommt, daß sie nur als Farbspur in Erscheinung tritt.

Eine Zuordnung dieser Isoenzyme der LDH zu den bekannten Proteinsystemen gelang auch hier nicht exakt. Die verschiedenen fermentaktiven Komponenten zeigten vielfach nur geringfügige Abweichungen in ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit von der Position der benachbarten Proteinfractionen.

Pathologische Seren zeigten wiederum eine große Variationsbreite mit Bezug auf quantitative Relationsverschiebungen (Abb. 4).

b) In Rattenserum

In den Seren unbehandelter Ratten konnten, ebenfalls wie beim Menschen, 5 Isoenzyme der LDH aufgezeigt werden. Gemessen an der Farbtintensität waren diese jedoch nur schwach vertreten, die relativ deutlichsten Farbreaktionen zeigten sich auch hier im Bereich der LDH 1-3.

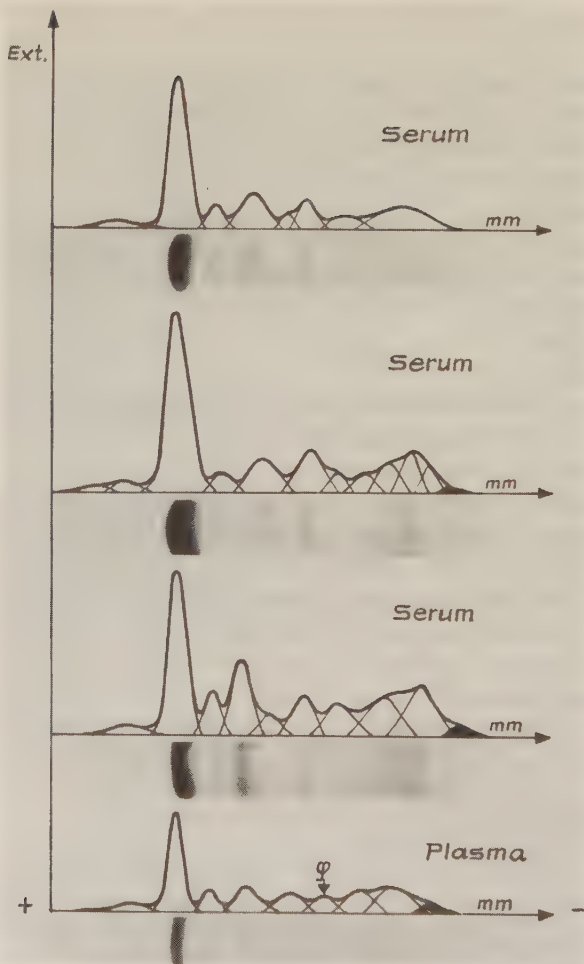
In den hier untersuchten pathologischen Seren der tumortragenden Ratten war durchweg folgende Besonderheit auffällig geworden: während die Isoenzyme der LDH₁ bis LDH₄ nur noch spurenhaf, in Einzelfällen überhaupt nicht darstellbar waren, zeichnete sich die LDH₅-Fraktion dagegen als besonders deutlich gefärbte, scharf begrenzte Komponente ab (Abb. 4).

3) Darstellung der Proteinfractionen

a) Menschliches Serum und Plasma

Die proteingefärbten Serumweißfraktionen von Gesunden waren durch die stark konzentrierte Albuminfraktion sowie durch vier weniger deutlich gefärbte Globulinfraktionen charakterisiert; unter den Globulinen zeichnete sich vielfach die β -Fraktion als schmalbasige Doppelkomponente ab, die γ -Globuline erwiesen sich dagegen als relativ breitbasiger Komplex. In vier von den untersuchten Normalseren war darüber hinaus ein Prae-Albumin nachweisbar.

Unter den pathologischen Seren war zunächst eine Vielzahl von Relationsunterschieden unter den einzelnen Proteinkomponenten wahrnehmbar, ferner das Auftreten von Sub- und Zwischenfraktionen vor allem im β/γ -, aber auch im α -Globulinbereich sowie schließlich der häufige Nachweis der Albuminvorfraktion (Abb. 5).



Prä-Alb. $\uparrow$ α_1 - α_2 - β_1 - β_2 - γ -Globuline
Albumin

Abb. 5 Streifen und Diagramme verschiedener pathologischer menschlicher Seren nach elektrophoretischer Trennung auf Celluloseacetatfolien und nachfolgender Färbung mit Amidoschwarz 10 B. An den Beispielen sollen Subfraktionen demonstriert werden, wie sie mit der herkömmlichen Papierelektrophorese nicht nachweisbar waren.

Unten eine Plasma-Analyse.

Die Analyse der verschiedenen Plasmen normaler und pathologischer Individuen zeigte in allen Fällen die Fibrinogenfraktion in typischer Position zwischen β - und γ -Globulinen (Abb.5).

Unterschiede bestanden lediglich in einer mehr oder weniger starken Anfärbbarkeit, mit anderen Worten, in einer unterschiedlichen Konzentration.

b) Rattenserum und - Plasmen

Die proteingefärbten Serumstreifen gesunder Tiere ließen zumeist 6 Fraktionen erkennen, die üblicherweise als Albumin, - α_1 -, α_2 -, α_3 (bzw. α_2/β -), β - sowie γ - Globuline bezeichnet werden.

Die Seren der tumortragenden Tiere zeigten eine deutliche Relationsverschiebung dieser 6 Fraktionen mit einer Hypalbuminämie und auffälliger Vermehrung vor allem der α_1 - und der α_2 -Globuline.

Die Fibrinogenfraktion trat in den Seren sowohl der unbehandelten als auch der tumortragenden Tiere außerordentlich schwach zutage. Die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit lag zwischen der von β - und γ - Globulinen.

Diskussion:

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war in erster Linie die Ergänzung und Überprüfung von Fermentnachweisreaktionen auf Celluloseacetatfolien im Vergleich zu den bekannten Proteinsystemen verschiedener Seren.

Wenn von den im menschlichen Serum nachweisbaren Fermentsystemen mit Isoenzymeigenschaften Esterasen und LDH gewählt wurden, dann deshalb, weil Esterasen, wie dies in anderem Zusammenhang vom eigenen Arbeitskreis bereits nachgewiesen wurde (6 , 11), im Ablauf verschiedener Krankheitsprozesse bestimmte Konstellationsänderungen aufweisen, die eine diagnostisch verwertbare Bedeutung erlangen können. Für die LDH, deren klinische Bedeutung längst außer Zweifel steht, sollte eine prinzipiell bekannte Methode auf ihre Verwendbarkeit im klinischen Routinelaboratorium geprüft werden.

Mit Bezug auf die Darstellbarkeit esteraseaktiver Fraktionen auf CA-Folien war auffällig, daß unter den gegebenen Versuchsbedingungen nur

die Pseudocholinesterasen demonstriert werden konnten, während die Cholinesterase, trotz Variation des Arbeitsganges (siehe Methodik) in keinem der Analysensätze nachweisbar wurde. Es ist anzunehmen, daß hier die Wirkung des in stärkerer Konzentration notwendigen Lösungsmittels für das Indoxylacetat, Aceton, auf die Folie den Reaktionsablauf für den Fermentnachweis unterbunden hat. In einer früheren Arbeit von KOHN (8a) wurde auf derartige Schwierigkeiten bei der Übertragung von biochemischen bzw. enzymatischen Reaktionen auf die CA-Folie bereits hingewiesen. Für die Pseudocholinesterasen gilt demgegenüber, daß für deren Nachweis einerseits Aceton in geringerer Menge für die Lösung des Azofarbstoffes notwendig wird, und daß andererseits die Pseudocholinesterasen im Serum in höherer Konzentration vorliegen. Im Vergleich zu Befunden im Agargel (6, 11) sind die Farbreaktionen auf CA-Folien auch für die Pseudocholinesterasen relativ schwächer ausgefallen. Ihre Auswertung wird nochmals erschwert durch die Transparentmachung der Streifen, wodurch stets ein relativer Farbverlust bzw. Verlust an Farbintensität festzustellen war. Allerdings gewährt der homogene CA-Streifen im Vergleich zum Agargel die relativ stichhaltigere Auswertung, die bei Verwendung potenzierender Integralschreiber sogar verbessert werden kann.

Die Befunde der Isoenzymdarstellung der LDH in den verschiedenen Serumproben stehen in weitgehender Übereinstimmung mit den Angaben der einschlägigen Literatur (1a, b, c; 7; 8; 14). Die Vorteile der CAF-Elektrophorese bestehen im Vergleich mit anderen kombinierten Elektrophorese- und Fermentnachweismethoden vor allem darin, daß in zwei kurzen und aufeinanderfolgenden Vorgängen, der Elektrophorese auf CA-Folien (ca 1 Std) und der Fermentnachweisreaktion (ca 20 min) zumeist schon ein sicheres diagnostisch und differentialdiagnostisch verwertbares Bild (Isoenzymverteilungsmuster) sich abgezeichnet hat. Für die praktisch klinische Bewertung erübrigt sich zumeist die semiquantitative Bestimmung der einzelnen dargestellten Isoenzyme mittels Integration, wie dies im übrigen auch in der einschlägigen Literatur hervorgehoben wird (1a-c). Somit sind auch die im methodischen Teil dieser Arbeit angeführten Schwierigkeiten, etwa bei der Transparentmachung, zu vernachlässigen.

Die Ergebnisse der einfachen Elektrophorese auf CA-Folien mit nachfolgender Proteinfärbung weisen zwar eine Reihe von Besonderheiten

in der Serumeiweißkonstellation der bislang bekannten 5 Hauptfraktionen auf -es gelingt z.B. der Nachweis einer Albuminvorfraktion oder die Darstellung von Subfraktionen im β - und γ -Globulinbereich- sie erweisen sich jedoch über die mit herkömmlichen Elektrophorese-techniken erzielbaren Befunde als nicht nennenswert überlegen. Hinzu kommt, daß die mit der CAF-Elektrophorese darstellbaren Serumeiweiß-Phänomene insbesondere in pathologischen Seren außerordentlich variabel und inkonstant sind. Ein entscheidender Vorteil der CAF-Elektrophorese gegenüber anderen Proteindifferenzierungsmethoden liegt jedoch - wie bereits angeführt - im schnellen Analysengang, was vor allem für die praktische Anwendung dieses Verfahrens im klinischen Routinelaboratorium Bedeutung erlangt.

Einen weiteren Vorteil bietet die Elektrophorese auf CA-Folien mit Bezug auf die Analyse von Plasmen, wobei es gelingt, jede Art von Plasma, d.h. ungeachtet der Zusätze, die verwendet wurden, um das Fibrinogen in Lösung zu halten, in klassischer Weise aufzutrennen (9). Das Fibrinogen erscheint hier an typischer Stelle zwischen β - und γ -Globulinen; es bleibt also in keinem Falle an der Auftragestelle liegen, wie dies bekanntlich bei der Trennung von Citrat- und Oxalatplasma mittels Papierelektrophorese beobachtet wird. Eine elektrophoretische Plasmadifferenzierung auf Papier gelingt nur dann, wenn das Plasma durch Zusatz von Heparin aufbereitet wurde (5, 10).

Zusammenfassung:

In vorliegenden Studien wurden insgesamt 25 menschliche Seren, davon 10 Seren von Gesunden, 15 von Patienten mit verschiedenen Krankheitsprozessen, sowie 10 Seren von unbehandelten Albinoratten und 15 von tumortragenden Ratten mittels Elektrophorese auf Celluloseacetatfolien in Kombination mit verschiedenen spezifischen Fermentnachweisreaktionen analysiert. Gewählt wurden dabei die Nachweisreaktionen für Esterasen und für die Lactatdehydrogenase.

Es konnte gezeigt werden, daß bei vorliegender Versuchsanordnung mit Bezug auf esteraseaktive Fraktionen nur unter Anwendung von β -Naphthylacetat verwertbare Ergebnisse erzielt werden konnten. Esteraseaktive Komponenten erstreckten sich, gemessen an ihrer elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit, vom Präalbuminbereich bis in

die Zone von α_2 -Globulinen. Es konnten insgesamt 4 Fraktionen nachgewiesen werden, die mit E_I, E_{II}, E_{III} , und E_{IV} bezeichnet wurden. In pathologischen Humansenen ließ sich eine gewisse Variationsbreite des Isoenzymmusters nachweisen. In den Seren der unbehandelten Ratten konnten, ähnlich wie beim Menschen, 4 Farbzonen festgestellt werden, die ebenfalls zwischen Albuminen und α_2 -Globulinen lagen. Die pathologischen Rattenserumseren zeigten wiederum Relationsänderungen innerhalb ihres Isoenzymverteilungsmusters.

Die Darstellung der LDH-aktiven Fraktionen in den Seren von Gesunden gelang regelmäßig. Dabei wurden 5 (6) Farbzonen (LDH 1-5) nachgewiesen, wobei LDH 1, 2 und 3 deutlich, LDH 4 und LDH 5 dagegen nur schwach in Erscheinung traten. Die pathologischen Seren wiesen deutliche Relationsverschiebungen im Isoenzymmuster auf. In den Seren der unbehandelten Ratten wurden ebenfalls 5 LDH-aktive Zonen aufgezeigt. In den Seren der tumortragenden Tiere trat als Besonderheit die LDH 5 als deutlich gefärbte und scharf begrenzte Fraktion stark in den Vordergrund, LDH 1-4 waren dagegen nur spurenhaf oder überhaupt nicht zu erkennen.

Die mit Amidoschwarz 10 B gefärbten Serumweißfraktionen von Gesunden zeigten das bekannte Proteinverteilungsmuster. In pathologischen Seren waren große Relationsverschiebungen unter den Proteinkomponenten wahrnehmbar. Die analysierten Humanplasmen ließen regelmäßig die Fibrinogenfraktionen zwischen β - und γ -Globulinen erkennen. In den Seren gesunder Tiere ließen sich zumeist 6 Proteinfaktionen erkennen. Die pathologischen Rattenserumseren zeigten eine deutliche Relationsverschiebung dieser Fraktionen im Sinne einer tumortypischen Disproteinämie. Die Fibrinogenfraktion trat in den Tierplasmen nur schwach in Erscheinung.

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s :

1. BARNETT, H.:

- a) Dehydrogenase isoenzymes.
Lancet II, 19, 199, London 1962
- b) Electrophoretic separation of lactate dehydrogenase isoenzymes on cellulose acetate.
Biochem.J. 84, 83 P, London 1962
- c) The staining of lactic dehydrogenase isoenzymes after electrophoretic separation on cellulose acetate.
J.Clin.Pathol. 17, 567, London 1964

2. BARTLETT, R. G.:

Rapid cellulose acetate electrophoresis. I. Qualitative and quantitative haemoglobin fractionation.
Clin. Chem. 9, 325 , New York 1963

3. BLACKWELL, R. Q. and C. S. LIU:

Haptoglobin type determination by cellulose acetate zone electrophoresis.
Clin. Chim.Acta 8, 867 , Amsterdam 1963

4. DEWEY, M. M. and J. L. CONKLIN:

Starch gel electrophoresis of lactic dehydrogenase from rat kidney.
Proc.Soc.exp.Biol.Med. 105, 492 (1960)

5. GÖTZ, H., M. MOUSSAZADEH und H. REICHEL:

Papier-und agarelektrophoretische Ergebnisse pathologischer Plasmaproteine unter besonderer Berücksichtigung des Fibrinogens.
Med. Welt 19, 1227 , 1968

6. GÖTZ, H., F. SCHEIFFARTH und F. VICTOR:

Studien über das Enzymmuster esteraseaktiver Komponenten im pathologischen Serum.
Clin. Chim. Acta 21, 119 (1968)

7. GRAYMORE, C.:

Possible significance of the isoenzymes of lactic dehydrogenase in the retina of the rat.

Nature 201, 615 (1964)

8. KOHN, J.:

a) A new supporting medium for zone electrophoresis.
Biochem J. 65, 9 (1957)

b) A cellulose acetate supporting medium for zone electrophoresis.

Clin. Chim. Acta 2, 297 (1957)

c) Rapid small-scale electrophoresis of abnormal haemoglobins.

Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg. 52, 4 (1958)

d) A lipoprotein staining method for zone electrophoresis.

Nature 189, 312 (1961)

e) Zur Technik der Celluloseazetat-Elektrophorese.
Ärztl. Lab. 10, 233 (1964)

f) Zur Technik der Celluloseazetat-Elektrophorese.
Ärztl. Lab. 10, 269 (1964)

9. OHLSEN, J. E.:

Rapid method for zone electrophoresis of serum and plasma proteins. The use of cellulose acetate strips.

Nebraska State Med. J. 46, 331 (1961)

10. SCHEIFFARTH, F., G. BERG und H. GÖTZ:

Plasma-Elektrophorese auf Filtrierpapier.

Hoppe-Seyler's Zschr. physiol. chem. 302, 126 (1955)

11. SCHEIFFARTH, F., H. GÖTZ und S. EBERT:

Über esteraseaktive Fraktionen in verschiedenen menschlichen Organextrakten.

Clin. Chim. Acta 14, 519 (1966)

12. SCHEIFFARTH, F., H. GÜTZ und R. FRICK:

Agarelektrophoretische Studien zum Nachweis von Iso-
enzymen der Lactatdehydrogenase in verschiedenen
menschlichen Organextrakten.

Enzymbiol.clin. 8, 283 (1967)

13. URIEL, J.:

a) Caractérisation des cholinestérases et d'autres
estérases carboxyliques après électrophorèse et
immunoelectrophorèse en gélose. I. Application à
l'étude des estérases du sérum humain normal.
Ann. Inst. Pasteur 101, 104 (1961)

b) in: GRABAR, P. et P. BURTIN:
Analyse Immunoelectrophoretique.
Masson & Cie ,Paris 1960, p 50-53

Immunoelktrophoretische Analyse
Elsevier Publ. Comp. Amsterdam 1964, S.61-64

14. VAN DER HELM, H. J.:

A simplified method of demonstrating lactic dehydrogena-
se isoenzymes in serum.

Clin. Chim. Acta 7, 124 (1962)

Herrn Prof. Dr. F. Scheiffarth möchte ich für die freundliche Überlassung des Themas und die Übernahme des Referats herzlich danken.

Ein besonderes Anliegen ist es mir, Fräulein Priv.-Doz. Dr. H. Götz, die mir immer mit Rat und Tat hilfreich zur Seite stand, meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

L e b e n s l a u f

Am 23. Dezember 1919 wurde ich als einzige Tochter des Dipl.-Ing. Ferdinand Schultz und seiner Ehefrau Tatjana, geb. Dmitrenko, in Charkow geboren.

Von 1928 bis 1938 besuchte ich in Charkow die 14. Volle Mittelschule, an der ich im Juni 1938 die Reifeprüfung ablegte. Im Wintersemester 1938/39 begann ich das Medizinstudium an der I. Medizinischen Hochschule zu Charkow und brachte dort 6 Semester zum Abschluß. 1940 bestand ich das Physikum. Im Herbst 1941 wurde mein Studium unterbrochen, da der Krieg ausbrach. Anfang 1943 wurde ich nach Deutschland umgesiedelt und eingebürgert.

1947 nahm ich mein Medizinstudium an der Friedrich-Alexander-Universität wieder auf und beendete es 1950 mit dem Staatsexamen. In der darauffolgenden Zeit war ich als Pflichtassistentin an der Universitäts-Frauenklinik und Universitäts-Kinderklinik tätig. Von 1953 bis 1963 wurde meine berufliche Fortbildung aus familiären Gründen, da ich Mutter von 2 schulpflichtigen Kindern war, unterbrochen.

Von Februar 1964 bis November 1966 war ich am Anatomischen Institut und von Dezember 1966 bis Januar 1968 an der Universitäts-Augenklinik Erlangen als Ärztin tätig.

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen Hauptstr. 109, (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990